

# Desempeño de los sistemas Cholera-SMART<sup>®</sup> y Pathogen-Detection-Kit<sup>®</sup> en el diagnóstico rápido del cólera

Hilda María Bolaños,<sup>1</sup> María Teresa Acuña,<sup>1</sup> Ana María Serrano,<sup>2</sup>  
Xinia Obando,<sup>3</sup> Hazel Mairena,<sup>4</sup> Lorena Cháves,<sup>5</sup> Flor Sandí,<sup>6</sup>  
Gina Rodríguez,<sup>7</sup> Mark L. Tamplin,<sup>8</sup> Enrique Pérez<sup>9</sup> y Elena Campos<sup>1</sup>

## Forma de citar

Bolaños HM, Acuña MT, Serrano AM, Obando X, Mairena H, Cháves L, Sandí F, Rodríguez G, Tamplin ML, Pérez E, Campos E. Desempeño de los sistemas Cholera-SMART<sup>®</sup> y Pathogen-Detection-Kit<sup>®</sup> en el diagnóstico rápido del cólera. Rev Panam Salud Publica. 2004;16(4):233–41.

## RESUMEN

**Objetivos.** Comparar el desempeño de dos sistemas rápidos de diagnóstico de cólera con el método de cultivo y proponer una estrategia que permita mejorar la especificidad y la sensibilidad de estos sistemas y disminuir los costos del diagnóstico.

**Métodos.** En el estudio participaron el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología (CNRB) del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) y hospitales de las provincias de Alajuela, Guanacaste y San José, en Costa Rica. Se emplearon 237 muestras de heces para evaluar el desempeño de dos pruebas rápidas para el diagnóstico de *Vibrio cholerae* O1: Pathogen Detection Kit<sup>®</sup> (PDK, Intelligent Monitoring Systems, Gainesville, Florida, EUA) y Cholera-SMART<sup>®</sup> (New Horizons Diagnostics Corp., Columbia, Maryland, EUA), tanto en forma directa (SMART directo y PDK directo) como a partir de cultivos de enriquecimiento de 6 horas (SMART-6 y PDK-6) y de 18 horas (SMART-18 y PDK-18) a 37 °C en agua de peptona alcalina. Las muestras diarreas y semiformadas se cultivaron y se evaluaron con las pruebas rápidas directas; cuando el resultado inicial era negativo se repitieron a las 6 y 18 horas de cultivo. Los hisopados rectales y fecales se evaluaron a partir de cultivos de enriquecimiento de 6 y de 18 horas. Adicionalmente se estudió la sensibilidad analítica de los sistemas rápidos con cultivos puros de 18 a 24 horas de incubación de *V. cholerae* O1 (cepa SOS-833, CNRB, Costa Rica) y se evaluó la utilidad del análisis microscópico de la motilidad para racionalizar el uso de las técnicas rápidas.

**Resultados.** La sensibilidad, tanto de SMART directo como de PDK directo, fue de 100% en muestras de heces diarreas y semiformadas y en contenido intestinal de cadáveres. Con estas muestras, el procedimiento SMART directo mostró una especificidad de 100%, mientras que con el PDK directo esta fue de 85,7% a 77,4%, en dependencia del tipo de muestra. Los resultados positivos falsos obtenidos mediante PDK directo resultaron negativos con PDK-6 y PDK-18. Entre los hisopados rectales y fecales de personas con y sin diarrea o que recibieron tratamiento

<sup>1</sup> Centro Nacional de Referencia en Bacteriología, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Apdo. 4-2250 Tres Ríos, Costa Rica. Correo electrónico: hbolanos@inciensa.sa.cr

<sup>2</sup> Laboratorio Clínico, Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega, San Ramón, Costa Rica.

<sup>3</sup> Laboratorio Clínico, Hospital Upala, Upala, Costa Rica.

<sup>4</sup> Laboratorio Clínico, Hospital Los Chiles, Los Chiles, Costa Rica.

<sup>5</sup> Laboratorio Clínico, Hospital Dr. Enrique Baltozano, Liberia, Costa Rica.

<sup>6</sup> Laboratorio Clínico, Hospital San Rafael, Alajuela, Costa Rica.

<sup>7</sup> Laboratorio, Clínica Marcial Fallas, Desamparados, Costa Rica.

<sup>8</sup> Departamento de Ciencias de la Familia y el Consumidor, Universidad de la Florida, Gainesville, Florida, EUA.

<sup>9</sup> Cooperación Técnica, Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis-INPPAZ/OPS-OMS, Buenos Aires, Argentina.

previo con antibióticos se observaron tres resultados negativos falsos con SMART-6 y dos con PDK-6, los cuales resultaron positivos mediante SMART-18 y PDK-18, respectivamente. Ambos sistemas mostraron una concordancia excelente (índice kappa superior a 0,9) en las diferentes modalidades evaluadas. La sensibilidad analítica de ambos sistemas fue de  $6 \times 10^7$  ufc/mL de *V. cholerae* O1, lo que concordó con la observación microscópica de 10 microorganismos o más con motilidad típica de vibriones por campo (aumento de 1000×). Las muestras con menos de 10 microorganismos con motilidad típica de vibriones tenían concentraciones entre  $6 \times 10^3$  y  $6 \times 10^6$  ufc/mL y solo resultaron positivas después de un enriquecimiento de 6–18 horas. Se propone una estrategia para establecer la presencia de *Vibrio cholerae* O1 en un tiempo inferior al de los métodos convencionales, con valores predictivos positivo y negativo de 100%.

**Conclusiones.** Los sistemas SMART y PDK permiten llegar a un diagnóstico certero de cólera en poco tiempo, no requieren de instrumental complejo ni de personal técnico altamente calificado y funcionan satisfactoriamente en condiciones de campo. Mediante la estrategia propuesta se pueden aumentar la especificidad y la sensibilidad de estos sistemas y se reducen los costos del diagnóstico, lo que permite recomendar su empleo para la vigilancia del cólera en áreas con escasos recursos, donde esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública.

### Palabras clave

Cólera, *Vibrio cholerae* O1, tests inmunológicos, valor predictivo de los tests.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda, endémica en lugares con deficiencias en el saneamiento básico y en la higiene personal y de los alimentos (1–4). Estas áreas han sido focos de epidemias que los fenómenos climáticos, las migraciones, el aumento de los viajes internacionales y el trasiego de alimentos han convertido en pandemias (4, 5).

Además de *Vibrio cholerae* O1 y de *V. cholerae* O139, otros enteropatógenos pueden elaborar toxinas similares a la colérica, por lo que también pueden producir cuadros diarreicos clínicamente indistinguibles del cólera (6–8). Aunque estas diarreas requieren del mismo tratamiento de rehidratación (9), únicamente cuando se trata de *V. cholerae* O1 y O139 se hace indispensable establecer medidas inmediatas de control epidemiológico que permitan limitar la propagación de la enfermedad (10–12). En vista del alto costo que implica movilizar recursos humanos y poner en marcha las medidas de control epidemiológico, la pronta respuesta del laboratorio en la identificación del patógeno causante de la enfermedad constituye un pilar fundamental en el control del cólera (11).

El diagnóstico convencional del cólera depende del aislamiento del microorganismo en medios selectivos y

de su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Este procedimiento, además de costoso, requiere de una infraestructura de laboratorio relativamente compleja y demora entre uno y tres días en dar resultados confiables (7, 11). En muchos de los países afectados por el cólera, la disponibilidad de laboratorios con capacidad para realizar cultivos bacteriológicos es reducida, por lo que ha sido necesario establecer sistemas de referencia en los niveles locales, regionales o centrales (13). Esta medida ocasiona gastos adicionales de transporte y, lo que es más grave aun, aumenta el tiempo necesario para llegar al diagnóstico y establecer las medidas de control epidemiológico.

En los últimos años se han desarrollado sistemas comerciales para el diagnóstico rápido de *V. cholerae* O1 y O139. Los primeros métodos para el diagnóstico rápido de *V. cholerae* O1 se basaron en anticuerpos policlonales que permitían identificar la bacteria directamente a partir de medios de aislamiento primario (14). La especificidad de estos primeros sistemas aumentó cuando se desarrollaron anticuerpos monoclonales específicos contra el antígeno A del lipopolisacárido de esta bacteria. Estos anticuerpos monoclonales se emplean en diferen-

tes sistemas diagnósticos, como el Cholera Screen® (New Horizons Diagnostics Corp., Columbia, Maryland, EUA), que se basa en la coaglutinación de células de *Staphylococcus aureus* recubiertas con uno de estos anticuerpos monoclonales (15, 16). En el sistema Pathogen Detection Kit® (PDK, Intelligent Monitoring Systems, Gainesville, Florida, EUA), los anticuerpos monoclonales están adsorbidos sobre partículas de látex, mientras que en el sistema Cholera SMART® (Sensitive Membrane Antigen Rapid Test, New Horizons Diagnostics Corp., Columbia, Maryland, EUA) ocurre la precipitación del anticuerpo monoclonal marcado con oro coloidal que reacciona con el *V. cholerae* O1 presente en la muestra. Luego, este complejo es capturado por un anticuerpo policlonal que se encuentra fijado sobre una membrana de nitrocelulosa, lo que hace posible visualizar el resultado (17). Más recientemente se han desarrollado sistemas inmunocromatográficos, como los llamados *dipstick*, para el diagnóstico rápido de *V. cholerae* O1 y O139 (18). Sin embargo, con excepción de las publicaciones que dan a conocer el desarrollo de estos sistemas, en la literatura existe poca información sobre sus resultados en condiciones de campo.

El objetivo del presente trabajo es comparar el desempeño de dos de estos sistemas rápidos de diagnóstico del cólera (Cholera SMART® y Pathogen Detection Kit®) con el cultivo como método de referencia y proponer una estrategia que permita mejorar la especificidad y sensibilidad de estos sistemas y disminuir los costos del diagnóstico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en el que participaron el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología (CNRB) del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA); los hospitales de Upala, Los Chiles, San Ramón (Dr. Carlos L. Valverde Vega) y San Rafael, todos en la provincia de Alajuela; el Hospital Dr. Enrique Baltodano, de Liberia, en la provincia de Guanacaste; y la Clínica Marcial Fallas, de San José. El estudio se llevó a cabo en 1996, durante los últimos brotes de cólera en Costa Rica.

El CNRB capacitó a funcionarios de los laboratorios participantes para la realización de las pruebas y entregó formularios precodificados para recopilar la información, instrucciones de los procedimientos y un estuche de cada una de las pruebas a evaluar. En total se recopiló la información de 237 muestras de heces, 213 de las cuales se analizaron mediante coprocultivo y pruebas rápidas. Las restantes 24 muestras se analizaron solo mediante las pruebas rápidas y se emplearon únicamente para comparar los dos métodos rápidos mediante el índice kappa. De las 237 muestras, 89 eran diarreicas, 12 semiformadas y 126 formadas (no diarreicas). En 10 casos no se especificó el tipo de muestra. De acuerdo con las instrucciones brindadas por el CNRB, la mayoría de las muestras se procesaron según sus características: las muestras diarreicas y semiformadas se cultivaron y se evaluaron con las pruebas rápidas directas; cuando el resultado inicial era negativo se repitió el análisis a las 6 y 18 horas de cultivo. Los hisopados rectales y fecales se evaluaron a partir de cultivos de enriquecimiento

de 6 y 18 horas. El número total de observaciones realizadas con el sistema PDK es ligeramente menor que el de las obtenidas con el SMART, ya que algunos laboratorios no aplicaron las dos pruebas en todos los casos.

### Procesamiento de las muestras

**Cultivo.** Las muestras fecales se enriquecieron en agua de peptona alcalina a pH 8,9–9,1 (APA, 1% de Bacto Peptona y 1% de NaCl) durante 4–6 horas a 37 °C. Después se tomó una asada de la superficie y se cultivó en agar tiosulfato con citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS, Difco Laboratories, Detroit, EUA). Después de 18–24 horas de incubación a 37 °C, las colonias amarillas características de *V. cholerae* se aislaron e identificaron mediante técnicas bioquímicas y serológicas convencionales (7, 11).

**SMART y PDK.** Se siguieron las instrucciones de los fabricantes para realizar las pruebas directamente a las heces (SMART directo, PDK directo). También se aplicaron estas pruebas a los cultivos en APA inoculados con hisopados rectales, fecales o del contenido intestinal de cadáveres después de 4–6 horas (SMART-6 y PDK-6) y de 18 horas (SMART-18 y PDK-18) a 37 °C. Todas las muestras que presentaron resultado positivo o dudoso con las pruebas rápidas fueron enviadas al CNRB para su confirmación.

**Sensibilidad analítica de SMART y PDK.** Colonias de un cultivo puro y fresco (de 18 a 24 horas de incubación) de la cepa SOS-833 de *V. cholerae* O1 (CNRB, Costa Rica) se resuspendieron en solución salina estéril (0,85% de NaCl) hasta alcanzar una turbidez comparable con la del estándar 2 de McFarland (aproximadamente  $6,0 \times 10^8$  células/mL). A partir de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas 1:10 en APA que se sembraron en placas con agar tripticosa soya (TSA, Difco Laboratories, Detroit, EUA) y se incubaron a 37 °C durante 18–24 horas para realizar el conteo de colonias. Cada dilución se evaluó con

los sistemas SMART y PDK, según las instrucciones del fabricante, a las 0, 6, 18 y 24 horas de incubación a 37 °C.

### Análisis microscópico de la motilidad

Con el fin de determinar si la observación de la motilidad al microscopio puede servir para racionalizar el uso de las técnicas rápidas, se revisaron retrospectivamente la información sobre el tipo de muestra y los resultados del cultivo y de la observación microscópica de la motilidad de las 138 muestras fecales o de enriquecimiento en APA estudiadas por ambos métodos en el CNRB entre 1992 y 1994, independientemente de su clasificación como positivas o negativas a *V. cholerae*.

La motilidad se observó en una gota de heces líquidas o una asada del cultivo de enriquecimiento en APA mediante un microscopio de luz con un objetivo de 100× y el diafragma parcialmente cerrado (aumento total de 1 000×). Se buscaron microorganismos con la motilidad típica de los vibriones, es decir, que atraviesan de lado a lado el campo microscópico como dardos (11).

Para estimar el límite de detección de células con la motilidad característica de los vibriones, se examinó al microscopio una alícuota de cada una de las diluciones empleadas para calcular la sensibilidad analítica de los sistemas SMART y PDK y se cuantificó el número de bacterias observado por campo.

### Métodos estadísticos

La información relacionada con el estudio microscópico de la motilidad de las muestras se evaluó mediante el análisis de proporciones. El cálculo de la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos (positivo y negativo) de las pruebas rápidas con relación al cultivo, bajo las diferentes combinaciones utilizadas, se realizó mediante procedimientos convencionales (19, 20) para grupos con más de 10 observaciones.

Se utilizó el índice kappa para evaluar la concordancia entre las observa-

ciones hechas con ambas pruebas rápidas. Según este índice, un valor inferior a 0,7 indica una baja concordancia, mientras que un valor de 1 indica una concordancia perfecta (21). Para ello se emplearon los resultados obtenidos con los sistemas SMART y PDK, tanto directo como después de 6 y 18 horas de cultivo, de las 213 muestras cultivadas y de las 24 muestras evaluadas con los dos métodos rápidos a las que no se les realizó un cultivo.

Según el tipo de muestra y la cantidad estimada de bacterias en las mismas (22), la variable "tipo de muestra" se codificó de la siguiente manera:

- Muestras con alta probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1: heces como "agua de arroz" y heces líquidas sin moco
- Muestras con mediana probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1: hisopados de contenido intestinal de cadáveres, heces semiformadas y diarreas que presentaban moco o sangre
- Muestras con baja probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1: hisopados rectales y fecales de individuos con o sin diarrea, y heces de personas con diarrea que iniciaron el tratamiento con antibióticos en las 24 horas previas a la obtención de la muestra.

La información acerca del tipo de muestra evaluada, el motivo del análisis, así como los resultados del cultivo

bacteriológico y de las pruebas rápidas realizadas se procesaron mediante el paquete estadístico Epi Info versión 6.0.

## RESULTADOS

De las 213 muestras analizadas mediante coprocultivo, solo en 48 (23%) se identificó *V. cholerae* O1. En los estudios de sensibilidad analítica, tanto el sistema SMART como el PDK detectaron suspensiones que contenían al menos  $6 \times 10^7$  ufc/mL de *V. cholerae* O1. Las muestras con concentraciones entre  $6 \times 10^3$  y  $6 \times 10^6$  ufc/mL solo dieron resultados positivos después de incubarse en APA durante 6–24 horas (cuadro 1).

El análisis directo de 63 muestras de heces de alta y mediana probabilidad mediante el sistema SMART mostró que su sensibilidad y su especificidad fueron de 100% (cuadro 2). De estas muestras, 28 eran características de la enfermedad, ya que eran líquidas sin moco y ocho de ellas eran como "agua de arroz". El desempeño del sistema SMART a partir de caldos de enriquecimiento con 6 horas de incubación (SMART-6) fue similar cuando se realizó en muestras de alta y mediana probabilidad. Sin embargo, el procedimiento SMART-6 dejó de detectar tres muestras de baja probabilidad, lo que redujo su sensibilidad y valor predictivo negativo (85,0% y 84,2% respectivamente). Estas tres muestras eran de personas sin diarrea que habían tenido contacto con casos de cólera. Al rein-

cubar estos tres caldos de enriquecimiento hasta 18–24 horas y repetir la prueba (SMART-18) se logró obtener reacciones positivas (cuadro 2). De esta forma, el sistema SMART aplicado a caldos de enriquecimiento con 18 horas de incubación (SMART-18) mantuvo una correlación de 100% con el método de cultivo, aun en muestras de baja probabilidad.

En 35 de las 165 muestras negativas por SMART analizadas mediante coprocultivo se identificaron: *Escherichia coli* como único agente en 14 casos, *Shigella* spp. en 10, *V. mimicus* en 4, *Salmonella* sp. en 1 caso, bacilos similares a *Campylobacter* en 1, trofozoitos de *Entamoeba coli* en 2, *Lambliia intestinalis* en 2 y *Ascaris lumbricoides* en 1 caso.

Cuando el PDK se aplicó en forma directa con 27 heces líquidas sin moco (PDK directo en muestras de alta probabilidad) se obtuvo una sensibilidad de 100% (cuadro 3). Sin embargo, dos muestras presentaron resultados positivos falsos, por lo que la especificidad fue de 85,7% y el valor predictivo positivo de 86,6%. En las 34 muestras fecales de mediana probabilidad, este procedimiento dio siete resultados positivos falsos, todos ellos en heces diarreas acuosas con moco, dos de las cuales también tenían sangre. En ninguna de estas muestras se encontró *V. cholerae* O1 y todas ellas fueron negativas con el SMART. En siete de las nueve muestras que dieron un resultado positivo falso por PDK directo se encontraron: *Escherichia coli* como

**CUADRO 1. Sensibilidad analítica de los sistemas SMART, PDK a diferentes tiempos de incubación (en horas) y de la observación microscópica de la motilidad "al fresco"**

Ufc/mL	Motilidad "al fresco" (células por campo) <sup>a</sup>	SMART <sup>b</sup>				PDK <sup>c</sup>			
		0 h	6 h	18 h	24 h	0 h	6 h	18 h	24 h
$6 \times 10^8$	$\geq 10$	+	+	+	+	3+	4+	4+	4+
$6 \times 10^7$	$\geq 10$	+	+	+	+	2+	4+	4+	4+
$6 \times 10^6$	$< 10$	-	+	+	+	-	3+	4+	4+
$6 \times 10^5$	-	-	d	+	+	-	3+	4+	4+
$6 \times 10^4$	-	-	-	+	+	-	-	3+	3+
$6 \times 10^3$	-	-	-	d	+	-	-	3+	3+

<sup>a</sup> Número aproximado de células con motilidad similar a la de los vibriones por campo. Aumento de 1 000×.

<sup>b</sup> d: resultado positivo débil (coloración rosado pálido en el punto de reacción).

<sup>c</sup> De acuerdo con las instrucciones del fabricante, los resultados se clasifican de manera ascendente según la intensidad de la reacción antes de dos minutos de 1+ a 4+.

único agente en cuatro de ellas, *Shigella* spp. en dos y trofozoitos de *Entamoeba coli* en una. Cuando estas muestras se analizaron a partir del enriquecimiento en APA después de 4–6 horas de incubación (PDK-6), todas resultaron negativas. Dos de los resultados positivos falsos salieron negativos cuando estas muestras se trataron con el amortiguador de extracción suministrado por el

fabricante de SMART antes de realizar el PDK en forma directa.

De los 31 hisopados rectales considerados de baja probabilidad, dos muestras correspondientes a personas sin diarrea que habían tenido contacto con casos de cólera dieron resultados negativos falsos mediante el sistema PDK. Una de esas muestras también resultó negativa mediante la prueba

SMART-6. La reincubación del caldo de enriquecimiento hasta las 18 horas (PDK-18) reveló una reacción positiva con ambas muestras (cuadro 3).

En 25 de las 164 muestras negativas por PDK que fueron analizadas mediante cultivo se identificaron: *Escherichia coli* como único agente en 11 casos, *Shigella* spp. en 7, *V. mimicus* en 4, *Salmonella* sp. en 1 caso, bacilos similares

**CUADRO 2. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del sistema SMART y sus modificaciones, en comparación con el cultivo, según el tipo de muestra<sup>a</sup>**

Desempeño	Número de observaciones								
	SMART directo			SMART-6			SMART-18		
	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
Verdaderos positivos	15	3	1 <sup>b</sup>	5	9	17	1	3	8
Verdaderos negativos	13	31	0	1	18	16	1	2	97
Positivos falsos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativos falsos	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Total de observaciones <sup>b</sup>	28	34	1	6	27	36	2	5	105
Sensibilidad (%)	100,0	100,0	NR <sup>c</sup>	NR	100,0	85,0	NR	NR	100,0
Especificidad (%)	100,0	100,0	NR	NR	100,0	100,0	NR	NR	100,0
Valor predictivo positivo	100,0	100,0	NR	NR	100,0	100,0	NR	NR	100,0
Valor predictivo negativo	100,0	100,0	NR	NR	100,0	84,2	NR	NR	100,0

<sup>a</sup> Alta: muestras con alta probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (heces como "agua de arroz" y líquidas sin moco); Media: muestras con mediana probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (hisopados de contenido intestinal de cadáveres, heces semiformadas y heces con moco o sangre); Baja: muestras con baja probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (hisopados rectales y fecales de personas con diarrea o sin ella, y muestras de heces de personas con diarrea que recibieron tratamiento con antibióticos antes de la obtención de la muestra).

<sup>b</sup> Algunas de las observaciones realizadas con SMART directo se repitieron con SMART-6 ó SMART-18, por lo que la suma del número de observaciones es diferente al número de muestras.

<sup>c</sup> NR: No se realizaron los cálculos debido a que se obtuvieron menos de 10 observaciones.

**CUADRO 3. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del sistema PDK y sus modificaciones, en comparación con el cultivo, según el tipo de muestra<sup>a</sup>**

Desempeño	Número de observaciones								
	PDK directo			PDK-6			PDK-18		
	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
Positivos verdaderos	13	3	0	5	8	15	1	3	10
Negativos verdaderos	12	24	0	1	18	14	0	1	80
Positivos falsos	2	7	0	0	0	0	0	0	0
Negativos falsos	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Total de observaciones <sup>b</sup>	27	34	0	6	26	31	1	4	90
Sensibilidad (%)	100,0	100,0	NR <sup>c</sup>	NR	100,0	88,2	NR	NR	100,0
Especificidad (%)	85,7	77,4	NR	NR	100,0	100,0	NR	NR	100,0
Valor predictivo positivo	86,6	30,0	NR	NR	100,0	100,0	NR	NR	100,0
Valor predictivo negativo	100,0	100,0	NR	NR	100,0	87,5	NR	NR	100,0

<sup>a</sup> Alta: muestras con alta probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (heces como "agua de arroz" y líquidas sin moco); Media: muestras con mediana probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (hisopados de contenido intestinal de cadáveres, heces semiformadas y heces con moco o sangre); Baja: muestras con baja probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (hisopados rectales y fecales de personas con diarrea o sin ella, y muestras de heces de personas con diarrea que recibieron tratamiento con antibióticos antes de la obtención de la muestra).

<sup>b</sup> Algunas de las observaciones realizadas con SMART directo se repitieron con SMART-6 ó SMART-18, por lo que la suma del número de observaciones es diferente al número de muestras.

<sup>c</sup> NR: No se realizaron los cálculos debido a que se obtuvieron menos de 10 observaciones.

**CUADRO 4. Concordancia de los sistemas SMART, PDK y sus modificaciones, según el tipo de muestra<sup>a</sup> (en paréntesis se indica el número de observaciones comparadas)**

Métodos comparados	Índice kappa crudo	Índice kappa según tipo de muestra		
		Alta	Media	Baja
SMART directo – PDK directo	0,71 (62)	0,92 (27)	0,59 (34)	NR <sup>b</sup> (1)
SMART-6 – PDK-6	0,96 (84)	NR (7)	1,00 (28)	0,98 (49)
SMART-18 – PDK-18	1,00 (109)	NR (1)	NR (4)	1,00 (104)

<sup>a</sup> Alta: muestras con alta probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (heces como “agua de arroz” y líquidas sin moco); Media: muestras con mediana probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (hisopados de contenido intestinal de cadáveres, heces semiformadas y heces con moco o sangre); Baja: muestras con baja probabilidad de aislamiento de *V. cholerae* O1 (hisopados rectales y fecales de personas con diarrea o sin ella, y muestras de heces de personas con diarrea que recibieron tratamiento con antibióticos antes de la obtención de la muestra).

<sup>b</sup> NR: No se realizaron los cálculos debido a que se obtuvieron menos de 10 observaciones.

a *Campylobacter* en 1 caso y estructuras semejantes a *Serpulina* en 1 caso.

Con excepción del valor kappa obtenido al comparar el SMART directo con el PDK directo en muestras de mediana probabilidad (0,59), las pruebas de SMART y PDK mostraron una concordancia excelente (superior a 0,9) en las diferentes variaciones evaluadas (cuadro 4).

En el análisis de la motilidad se encontraron 65 muestras (47%) con bacterias que tenían la motilidad característica de los vibriones, en 21 de las cuales se logró aislar *V. cholerae* O1. En las restantes 44 muestras se identificaron otras enterobacterias: *V. mimicus* en 19 muestras, otros serogrupos de *V. cholerae* en 3, vibriones halófilos en 2, *Aeromonas* spp. en 8, *Plesiomonas shigelloides* en 1, y en las 11 restantes no se buscaron otros patógenos. En las 73 muestras restantes (53%) no se observaron microorganismos con la motilidad característica de los vibriones y de ninguna de ellas se aisló *V. cholerae* O1. Sin embargo, se identificaron *Escherichia coli* como único microorganismo en 15 muestras, *Shigella* spp. en 2 casos, *Salmonella* spp. en 4, rotavirus en 2 casos y *Lamblia intestinalis* en otros 2.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de métodos diagnósticos rápidos, específicos, sensibles y económicos es de suma importancia para la detección temprana de patógenos como *V. cholerae* O1, ya que no solo permiten suministrar oportunamente

el tratamiento específico, sino también iniciar de manera ágil y racional las medidas de control epidemiológico (3, 10–12, 18, 23).

Los resultados del presente estudio muestran que tanto el sistema SMART como el PDK, utilizados en las condiciones propuestas, permitieron establecer en menor tiempo el diagnóstico de *V. cholerae* O1 en todas las muestras de heces que resultaron positivas por cultivo. El límite de detección de las pruebas permitió diagnosticar *V. cholerae* O1 en forma directa en las heces de pacientes que presentaron diarrea líquida sin moco o del tipo “agua de arroz”, en las que se estima que la concentración de vibriones es superior a  $10^7$  ufc/mL y que probablemente suponen un mayor riesgo de transmisión (22). Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para el SMART directo en muestras consideradas de alta probabilidad son similares a los informados en el estudio de campo realizado por el International Centre for Diarrhoeal Disease Research en Bangladesh, en el que 22 de las 23 muestras (95,6%) de heces de pacientes con síntomas de cólera fueron positivas, tanto por SMART directo como por cultivo, mientras que las restantes 22 muestras fueron negativas por ambos procedimientos (17).

A pesar de que entre las muestras analizadas durante el período en que se llevó a cabo esta evaluación no se encontraron reacciones positivas falsas con el sistema SMART directo, en nuestra experiencia de siete años en el uso de esta prueba se han observado

al menos cuatro reacciones positivas falsas con relación al cultivo. En todos los casos se trataba de heces diarreicas con moco, dos de las cuales también tenían sangre. En una de ellas se identificó una especie de *Rotavirus*, en una *Shigella sonnei*, en otra *Escherichia coli* como único microorganismo y en la otra no se identificaron patógenos. Por lo anterior, no se recomienda aplicar la prueba SMART directamente a las heces que presentan estas características o el análisis de las muestras positivas debe repetirse después de 6 horas de incubación en APA.

Los resultados del desempeño del sistema PDK directo en muestras consideradas de alta probabilidad fueron similares a los encontrados en Perú en 100 muestras de pacientes con síntomas clínicos de cólera, con otra prueba de aglutinación en látex basada en anticuerpos monoclonales (16). Con el PDK se observaron dos reacciones positivas falsas cuando la prueba se realizó directamente a partir de las heces líquidas o en “agua de arroz”. Sin embargo, cuando se repitió la prueba de PDK con muestras tratadas previamente con el amortiguador de extracción del SMART se logró eliminar la reacción inespecífica, por lo que se recomienda al fabricante estudiar la posibilidad de añadir en esta técnica un tratamiento previo de la muestra con un amortiguador de extracción. El sistema PDK tuvo una menor especificidad cuando se evaluaron directamente otros tipos de heces diarreicas, principalmente las que tenían moco o sangre. En estos casos se recomienda realizar la prueba a partir del enriquecimiento en APA durante 6 horas a 37 °C, con lo que se logra eliminar los resultados positivos falsos.

En el presente estudio se observaron algunas reacciones negativas falsas, tanto con el SMART-6 como con el PDK-6, cuando la prueba se realizó a partir de hisopados rectales y fecales de personas asintomáticas estudiadas por haber tenido contacto con casos de cólera. Esto podría deberse a que las muestras contenían cantidades de bacterias inferiores al límite de detección de dichas pruebas ( $10^7$  ufc/mL). Estos resultados son similares a los informa-

**CUADRO 5. Tiempo necesario para establecer el diagnóstico de *V. cholerae* O1 por cultivo y mediante pruebas rápidas, según el tipo de muestra**

Tipo de muestra	Tiempo necesario para establecer el diagnóstico		
	Cultivo	SMART	PDK
Alta probabilidad (heces como "agua de arroz" y líquidas sin moco)	18–24 horas	10 minutos	2 minutos
Mediana probabilidad (heces diarreicas con moco y sangre, heces semiformadas, hisopados de contenido intestinal de cadáveres)	24–48 horas	6 horas	6 horas
Baja probabilidad (muestras e hisopados de personas asintomáticas y de personas con diarrea tratadas con antibióticos antes de la obtención de la muestra)	24–48 horas	18 horas	18 horas

dos por Abbot y Janda que emplearon el sistema rápido Cholera Screen® de forma directa para diagnosticar *V. cholerae* O1 en hisopados rectales de personas con síntomas de la enfermedad o sin ellos (24). En estas situaciones y cuando es probable que la muestra contenga un pequeño número de bacterias, como es el caso de personas que han iniciado el tratamiento con antibióticos, es necesario prolongar la incubación de la muestra en el caldo de enriquecimiento hasta las 18 horas. En estos casos se gana en sensibilidad, aunque aumenta el tiempo necesario para establecer el diagnóstico (18 horas), que sigue siendo, no obstante, uno o dos días menor que el que se requeriría para establecer el diagnóstico por cultivo (cuadro 5).

La sensibilidad y especificidad logradas con los procedimientos SMART-6 y PDK-6 en muestras de mediana probabilidad son superiores a las informadas por Bhuiyan y colaboradores (92% y 91%, respectivamente) mediante un sistema del tipo *dipstick* para el diagnóstico del cólera en hisopados rectales de pacientes hospitalizados por diarrea, con un enriquecimiento previo de 4 horas en APA (23).

La observación microscópica de la motilidad de la muestra "al fresco" es una prueba sencilla, disponible en cualquier laboratorio y que puede ser de utilidad para optimar el uso de las pruebas rápidas, ya que estas son positivas solo cuando la concentración de bacterias en la muestra es superior a  $10^7$  ufc/mL, que es el límite de detección al

microscopio (cuadro 1). Si en el presente trabajo se hubieran utilizado los resultados del análisis de la motilidad con ese propósito, se habrían realizado las pruebas rápidas únicamente al 47% del total de las muestras analizadas y se hubiera ahorrado su uso en 73 muestras que no tenían microorganismos con la motilidad típica de los vibriones. Con esa medida, además de obtenerse una excelente correlación con los resultados del cultivo, se habrían ahorrado recursos de laboratorio.

Los resultados del presente estudio indican que las pruebas rápidas de SMART y PDK son muy versátiles y pueden constituir un recurso importante para la vigilancia del cólera si se siguen los criterios siguientes:

1. Las pruebas se deben realizar de manera directa cuando las heces son del tipo "agua de arroz" o líquidas sin moco ni sangre y cuando en la observación de las muestras en el microscopio "al fresco" se observan microorganismos con la motilidad característica de los vibriones.
2. Si en la muestra o caldo de enriquecimiento no se observan al microscopio bacterias con la motilidad característica de los vibriones, se debe incubar en APA de 6 a 18 horas y volver a examinar la motilidad al microscopio antes de aplicar la prueba rápida.
3. Cuando se trate de muestras que puedan tener poco material fecal o que provengan de personas asintomáticas o que recibieron una dosis

de antibiótico, se recomienda realizar las pruebas rápidas únicamente a partir de la incubación durante 18 horas en caldo de enriquecimiento.

Los sistemas SMART y PDK son técnicas diseñadas para el tamizaje, por lo que su empleo no excluye la necesidad de realizar el cultivo e identificar el vibrión del cólera, medidas indispensables para tipificar la bacteria (serogrupo, serotipo, biotipo), identificar la toxina colérica, vigilar la resistencia a los antibióticos y realizar estudios filogenéticos, todo ello de gran importancia para la salud pública (11). Se deben realizar controles de calidad a cada nuevo lote de pruebas rápidas, según las instrucciones del fabricante, a fin de verificar la sensibilidad de las pruebas y comprobar periódicamente el funcionamiento correcto de los controles provistos por estos sistemas comerciales.

Los sistemas SMART y PDK permiten llegar a un diagnóstico certero de cólera en poco tiempo, no requieren de instrumental complejo ni de personal técnico altamente calificado y tienen un desempeño satisfactorio en condiciones de campo. Los resultados obtenidos demuestran que mediante la estrategia propuesta se pueden mejorar la especificidad y la sensibilidad de estos sistemas y se reducen los costos del diagnóstico, lo que permite recomendar su empleo para la vigilancia del cólera en áreas con escasos recursos, en las que esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública.

**Agradecimientos.** Este trabajo es parte de una tesis de Maestría en Epidemiología del Programa Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, de la Universidad Nacional de Costa Rica, realizada con fondos de INCIENSA-FODESAF, del Ministerio de Salud y de la Caja Costarricense de Seguro Social. Se agradece a International Monitoring Systems la donación de los reactivos de PDK; a Luz Marina Sánchez, Olga Sánchez, Candy Barquero y Gretel Mora su apoyo técnico; y a los doctores Louise Maranda, Norman Rojas y Fernando García la revisión crítica del manuscrito.

## REFERENCIAS

1. Tauxe RV, Seminario L, Tapia R, Libel M. The Latin American epidemic. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik Ø, eds. *Vibrio cholerae* and cholera, molecular to global perspectives. Washington, D.C.: ASM Press; 1994. Pp. 321–44.
2. Guthmann JP. Epidemic cholera in Latin America: spread and routes of transmission. *J Trop Med Hyg.* 1995;98:419–27.
3. Drasbek CJ, Rivas MO, Benguigui Y. Cholera surveillance in the Americas, 1991–1996. Epidemiological perspective and summary of international efforts to improve country surveillance and diagnostic network. Washington, D.C.: PAHO; 1996. (PAHO/HCP/HCT/ARI-CDD/96.38).
4. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Atención integrada de las enfermedades prevalentes de la infancia (AIEPI). Situación del cólera en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 1999. (OPS/HCP/HCT/AIEPI/99.3; Informe No.19).
5. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* 1996;274:2025–31.
6. Farmer JJ, Kelly T. Enterobacteriaceae. In: Balows A, Hausler NJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of clinical microbiology.* Washington, D.C.: ASM Press; 1991. Pp. 360–83.
7. Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III. *Vibrio.* In: Balows A, Hausler NJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of clinical microbiology.* Washington, D.C.: ASM Press; 1991. Pp. 384–95.
8. Cholera Working Group. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet.* 1993;342:387–90.
9. Holmgren J. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature.* 1981;292:413–17.
10. Gupta PGS, Sircar BK, Mondal S. Effect of doxycycline on transmission of *Vibrio cholerae* infection among family contacts of cholera patients in Calcutta. *Bull WHO.* 1978;56:323–6.
11. Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades, Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae.* Atlanta, GA: CDC; 1994.
12. Kabir I, Khan WA, Haider R, Mitra AK, Alam AN. Erythromycin and trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of cholera in children. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1996;14:243–7.
13. Nicaragua, Ministerio de Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Plan de Prevención y Control del Cólera en Nicaragua. Managua: Ministerio de Salud; 1991.
14. Rahman M, Sack DA, Wadood A, Yasmin M, Latif A. Rapid identification of *Vibrio cholerae* O1 from primary isolation plates by coagglutination test. *J Med Microbiol.* 1989;28:38–41.
15. Colwell RR, Hasan JAK, Huq A, Loomis L, Siebeling RJ, Torres M, et al. Development and evaluation of a rapid, simple, sensitive, monoclonal antibody-based co-agglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Letters.* 1992;97:215–20.
16. Carrillo L, Gilman RH, Mantle RE, Nuñez N, Watanabe J, Moron J, et al. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 in stools of Peruvian cholera patients by using monoclonal immunodiagnostic kits. *J Clin Microbiol.* 1994;32:856–7.
17. Hasan JAK, Huq A, Tamplin ML, Siebeling RJ, Colwell RR. A novel kit for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol.* 1994;32:249–52.
18. Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guérolé A, et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:476–8.
19. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions.* New York: Wiley; 1981.
20. Lilienfeld AM, Lilienfeld DE. *Fundamentos de epidemiología.* Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana; 1987.
21. Noordhuizen JPTM, Frankena K, Van der Hoof A, Graat EAM. *Applications of quantitative methods in veterinary epidemiology.* Wageningen, Netherlands: Wageningen Press; 1997.
22. Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM. Cholera. *Clinical Microbiol Rev.* 1995;8:48–86.
23. Bhuiyan NA, Qadri F, Faruque ASG, Malek MA, Salam MA, Nato F, et al. Use of dipsticks for rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 from rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2003;39:39–41.
24. Abbott SL, Janda JM. Rapid detection of acute cholera in airline passengers by coagglutination assay. *J Infect Dis.* 1993;168:797–8.

Manuscrito recibido el 4 de noviembre de 2003. Aceptado para publicación, tras revisión, el 6 de agosto de 2004.

## ABSTRACT

### Performance of Cholera-SMART® and Pathogen-Detection-Kit® in the quick diagnosis of cholera

**Objectives.** To compare the performance of two rapid systems for the diagnosis of cholera with the culture method, and to propose a strategy for improving the specificity and sensitivity of these systems and reducing the costs involved in making a diagnosis. **Methods.** The following institutions participated in the study: the National Bacteriology Referral Center (Centro Nacional de Referencia en Bacteriología, CNRB) of the Costa Rican Institute for Research and Teaching in Nutrition and Health (Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, INCIENSA) and various hospitals in the provinces of Alajuela, Guanacaste and San José, in Costa Rica. A total of 237 feces samples were used to assess the performance of two tests for the rapid detection of *Vibrio cholerae* O1: the Pathogen Detection Kit® (PDK, Intelligent Monitoring Systems, Gainesville, Florida, USA) and Cholera-SMART® (New Horizons Diagnostics Corp., Columbia, Maryland, USA), both when applied directly (direct SMART and direct PDK) and when applied to specimens cultured in broth-enriched medium for 6 hours (SMART-6 and CPK-6) and for 18 hours (SMART-18 and PDK-18) at 37 °C in alkaline peptone water. Liquid and partially formed stools were cultured and examined by means of the rapid direct test; when the initial result was negative, the tests were repeated after culture for periods of 6 and 18 hours. Rectal and fecal swabs were obtained from feces cultured in enriched-broth medium for 6 and 18 hours. In addition, we studied the sensitivity of the rapid testing systems by using pure cultures of *V. cholerae* O1 (strain SOS-833, CNRB, Costa Rica) that were incubated for 18 to 24 hours, and we assessed the usefulness of observing motility under the microscope in order to rationalize the use of rapid methods.

**Results.** The sensitivity of the direct SMART test and of the direct PDK test was 100% when samples obtained from liquid and partially formed stools and from the intestinal contents of dead bodies were used. With these samples, the direct SMART procedure showed a specificity of 100%, whereas the direct PDK procedure showed a specificity that ranged from 85.7% to 77.4%, depending on the type of sample. False positives obtained with the direct PDK method turned out to be negative with PDK-6 and PDK-18. Among the rectal and fecal swabs of persons with and without diarrhea or who had received prior treatment with antibiotics, three results that were negative with the SMART-6 procedure and two that were negative with the PDK-6 procedure turned out to be positive with the SMART-18 and PDK-18 procedures, respectively. Both systems showed excellent concordance (kappa index above 0.9) throughout. Both systems were sensitive to  $6 \times 10^7$  colony-forming units per milliliter (cfu/mL), which was concordant with the microscopic observation of 10 microorganisms or more per field with the type of motility that characterizes vibrios (at 1 000 $\times$  magnification). Samples having fewer than 10 microorganisms with the motility that characterizes vibrios had concentrations between  $6 \times 10^3$  and  $6 \times 10^6$  cfu/mL and became positive only after incubation in enriched-broth medium for 6 to 18 hours. We propose a strategy for diagnosing the presence of *V. cholerae* O1 infection in less time than it takes with traditional methods, with positive and negative predictive values of 100%.

**Conclusions.** The SMART and PDK systems make it possible to accurately diagnose cholera quickly, don't require sophisticated equipment or highly qualified technical personnel, and perform satisfactorily in field conditions. Through the proposed strategy, it becomes possible to improve the specificity and sensitivity of these systems and to reduce the cost of making a diagnosis, thus making them suitable for use in cholera surveillance in low-income settings where this disease is a serious public health problem.

*The healthy, the strong individual, is the one who asks for help when he needs it. Whether he has an abscess on his knee or in his soul.*

[La persona sana y fuerte es la que pide ayuda cuando la necesita. No importa si el absceso está en el cuerpo o en el alma.]

Rona Barrett